

Estabilidad de diagnosticador para infecciones vaginales

Diagnosis method stability used for vaginal infections

Arsenio Betancourt Bravo^I; Maite Lorenzo Hernández^{II}; Lilian Sánchez Miranda^{III}; Octavio Fernández Lima^{IV}

^I Licenciado en Bioquímica. Investigador Auxiliar. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

^{II} Máster en Microbiología Veterinaria. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

^{III} Doctor en Ciencias Veterinarias. Investigador Auxiliar. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

^{IV} Doctor en Ciencias Veterinarias. Investigador Titular. San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

RESUMEN

FemPure es un diagnosticador de infecciones vaginales compuesto por componentes biológicos multidosis. Se estudió su estabilidad en condiciones reales de conservación durante el uso hasta agotar el contenido del frasco y a largo plazo por 24 meses. Durante la estabilidad en uso los indicadores de la calidad mantuvieron los valores en los límites de aceptación establecidos. A largo plazo los látex-anti *T. vaginalis* y anti *C. albicans* conservaron las propiedades físicas, la detectabilidad y valores de sensibilidad y especificidad mayores del 90 %. El látex-anti *G. vaginalis* a los 18 meses no detectó *G. vaginalis* a la concentración establecida como límite de detección, lo que coincidió con la disminución de la sensibilidad hasta 71 %. Se conservó por primera vez una mezcla estable de suspensiones celulares compuesta por bacteria, levadura y parásito como control positivo. El control positivo a los 24 meses disminuyó su funcionamiento por daño celular del parásito *T. vaginalis*. Se estableció 12 meses como tiempo de validez del producto.

Palabras clave: Estabilidad durante el uso, estabilidad a largo plazo, diagnosticador, infecciones vaginales.

ABSTRACT

RemPure is a diagnosis tool for vaginal infections composed of multidose biological compounds. Its stability level under real conditions of preservation during from its use to selling-out of content and long-term at 24 hours was studied. During use of stability, quality indicators remain values within established acceptance limits.

T. vaginalis and anti-*C. albicans* maintained physical properties, detection parameters, and sensitivity and specificity values over 90 %. The use of latex-anti *G vaginalis* at 18 months fails in the detection of this parasite at established concentration to detection limit, coinciding with decrease in sensitivity up to 71 %. We preserved a stable mix of cellular suspensions composed of bacterium, yeast, and parasite as a positive control. This control at 24 months decreases its functioning by cellular damage caused by *T. vaginalis* parasite.

Key words: Stability during its use, long-term stability, diagnosis tool, vaginal infections.

INTRODUCCIÓN

La estabilidad de los productos biofarmacéuticos es una etapa imprescindible en el diseño de nuevos productos. Los estudios preliminares de estabilidad acelerada y en condiciones de estrés de los productos biológicos aportan información complementaria sobre la estabilidad del producto; sin embargo, para avalar las condiciones de almacenamiento y tiempo de validez se exige realizar el estudio en condiciones reales de conservación a largo plazo. Una situación particular presenta los productos multidosos que requieren comprobar su estabilidad durante el tiempo de uso después de la apertura del frasco.¹

FemPure es un diagnosticador inmunológico para vaginitis infecciosa que tiene 3 reactivos formados por partículas de látex unidas a anticuerpos específicos capaces de detectar *Trichomonas vaginalis*, *Candida spp* y *Gardnerella vaginalis*, un látex control negativo conjugado con inmunoglobulinas de animales no inmunizados para detectar reacciones inespecíficas, control negativo y control positivo ambos para el control interno de la calidad del ensayo.

El carácter biológico de los componentes del FemPure y la forma multidosos de presentación definieron como objetivo de trabajo realizar los estudios de estabilidad durante el uso y a largo plazo en condiciones reales de conservación.

MÉTODOS

Se estudió la estabilidad de 3 lotes producidos a escala industrial de cada componente durante el uso y a largo plazo² en condiciones reales de conservación de 2 a 8 °C.

La estabilidad durante el uso se realizó por 60 d hasta agotar el contenido del frasco multidosis. Se evaluaron 2 frascos por lote de cada componente con una frecuencia de 7 d para los látex unidos a anticuerpos (látex-Ac) y una frecuencia de 15 d para los controles internos del ensayo. Los componentes se consideraron estables cuando cumplieron los criterios de aceptación establecidos ([tabla 1](#)).

Tabla 1. Criterios de aceptación para considerar un componente estable durante la estabilidad en uso en condiciones reales de conservación

Componente	Control positivo	Control negativo
Látex-Ac específico	Aglutina (escala arbitraria 2 y 3 cruces)	No aglutina (escala arbitraria 0 y 1 cruz)
Látex-Ac control negativo	No aglutina	No aglutina
Componente	Látex-Ac específico	Látex-Ac control negativo
Control positivo triple	Aglutina	No aglutina
Control negativo	No aglutina	No aglutina

La estabilidad a largo plazo de los componentes se evaluó a los 0, 6, 12, 18 y 24 meses. Se emplearon los criterios de aceptación utilizados en la estabilidad en uso y se incorporaron otros basados en las características físicas de los componentes,³ como fácil resuspensión de la suspensión de látex-Ac y del control positivo, así como ausencia de turbidez y medición de pH= 7,0 ± 0,5 del control negativo. Se comprobó el límite de detección de los látex-Ac con el empleo de suspensiones celulares de cada microorganismo a una concentración entre 1 x 10⁴ y 1 x 10⁷ UFC/mL (células/mL para *T. vaginalis*), y se determinaron los indicadores de funcionamiento sensibilidad y especificidad clínicas calculados con 60 muestras de un panel de referencia compuesto por muestras positivas y negativas (50 %), se emplearon muestras contaminadas de forma artificial en los casos de baja prevalencia de la infección.⁴

Se utilizó análisis de proporciones del paquete estadístico Statistica versión 6,0 para comparar los valores de sensibilidad y especificidad clínicas obtenidos al inicio y a diferentes tiempos del estudio de estabilidad para evaluar el desempeño del diagnosticador.

RESULTADOS

Los indicadores de calidad para los 3 lotes de los componentes del diagnosticador mostraron resultados comprendidos en los límites de aceptación establecidos para la estabilidad en uso durante 60 d hasta agotar el contenido del frasco.

Los látex-anti *T. vaginalis* y látex-anti *C. albicans* a los 24 meses mantuvieron las propiedades físicas como suspensión blanca de fácil resuspensión que no presentó autoaglutinación, conservaron su funcionamiento frente a los controles internos de la calidad, sin variaciones de la sensibilidad, la especificidad y la detectabilidad en el límite de detección de la prueba. Los 3 lotes de látex-anti *G. vaginalis* conservaron las propiedades físicas de la suspensión y la especificidad a los 18 meses ([tabla 2](#)), pero perdieron la capacidad de detectar *G. vaginalis* a la concentración de 1 x 10⁶ UFC/mL establecida como límite de detección de la prueba, resultado que coincidió con una disminución significativa de la sensibilidad que continuó decreciendo hasta los 24 meses.

Tabla 2. Sensibilidad y especificidad durante la estabilidad a largo plazo del diagnosticador

Componente	Sensibilidad clínica (%)				
	Inicio	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses
Látex anti <i>G. vaginalis</i>	88,8	96,6	83,3	71,0*	66,7*
Látex anti <i>C. albicans</i>	96,7	100	100	94,5	92,9
Látex anti <i>T. vaginalis</i>	100	100	100	98,5	100
Componente	Especificidad clínica (%)				
	Inicio	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses
Látex anti <i>G. vaginalis</i>	93,4	96,7	100	100	100
Látex anti <i>C. albicans</i>	96,6	96,7	90,0	96,4	96,7
Látex anti <i>T. vaginalis</i>	99,6	100	100	100	100

*Diferencia significativa ($p < 0,001$).

El control positivo triple se mantuvo durante los 24 meses como una suspensión semitransparente de fácil resuspensión que aglutinó fuerte con los látex *anti G. vaginalis* y látex *anti C. albicans* (escala arbitraria de 3 cruces); sin embargo, ocurrió una disminución de la reacción frente al látex anti *T. vaginalis* con una aglutinación débil en los 3 lotes (escala arbitraria de 1 cruz), situación que se agravó al extender el tiempo de evaluación hasta los 27 meses con ausencia de aglutinación (escala arbitraria de 0 cruz). Por otra parte, el control negativo resultó estable durante los 24 meses de estudio, mantuvo las propiedades de solución transparente sin precipitado y valores de $\text{pH} = 7,0 \pm 0,32$ que cumplió con la especificación establecida.

DISCUSIÓN

Las condiciones de manipulación diaria con las variaciones de la temperatura de conservación (2 a 8 °C) por la temperatura de ejecución de las evaluaciones que se consideró como la ambiente del país (30 ± 2 °C), no influyeron sobre los resultados durante la estabilidad en uso hasta el agotamiento de los frascos.⁵ El comportamiento observado demostró la robustez del diagnosticador en las condiciones de trabajo diario del laboratorio.⁶

El desempeño de los látex-anti *T. vaginalis* y anti *C. albicans* con los controles de la calidad, la conservación de los valores de la sensibilidad, la especificidad y el límite de detección evidenciaron su estabilidad durante 24 meses. La suspensión de látex anti *G. vaginalis* aunque mantuvo sus propiedades físicas, disminuyó su desempeño a partir de los 18 meses con una menor detectabilidad y sensibilidad, indicadores asociados a la pérdida de la capacidad para detectar muestras positivas, deficiencia que se observó en muestras con baja concentración del agente infeccioso, sin embargo se detectaron muestras con alta concentración del microorganismo que son frecuentes en pacientes sintomáticos.^{7,8}

Se considera que el suero policlonal anti *G. vaginalis* obtenido, no logró una elevada concentración de anticuerpos, de manera que las partículas de látex no quedaron recubiertas en su mayoría por anticuerpos de alta afinidad para el antígeno diana de la prueba, lo que influyó sobre la estabilidad a largo plazo del componente.^{9,10}

Se logró por primera vez mantener una mezcla estable de suspensiones celulares (control positivo triple) compuesta por bacteria, levadura y parásito, microorganismos que presentan diferencias de tamaño, permeabilidad y resistencia a los cambios de temperatura y osmolaridad del medio.¹¹ El sistema de conservación utilizado evitó el decrecimiento de la concentración inicial del microbio, lo que permitió mantener la aglutinación de los látex-Ac frente al control positivo almacenado por un largo período, comportamiento que coincide con la estabilidad hallada a largo plazo por otros autores¹² que conservaron con éxito suspensiones celulares de un solo microorganismo a temperatura de refrigeración (2-8 °C) e inclusive a temperatura ambiente del laboratorio (20-25 °C).

Se considera que *T. vaginalis* a partir de los 24 meses presentó un daño en la membrana celular con pérdida de la aglutinación, debido a que resultó el microorganismo más lábil por su mayor tamaño y área superficial, lo que pudo provocar pérdida de los antígenos de la membrana celular relacionados con la reacción de aglutinación.¹¹ Existe otra evidencia que corroboró la menor estabilidad de *T. vaginalis* por estudio realizado sobre sistema de obtención y transportación de *T. vaginalis*, *Candida spp* y *G. vaginalis* para su detección por hibridación de ácidos nucleicos, donde se encontró que *T. vaginalis* tuvo mayor pérdida celular que los restantes agentes infecciosos mencionados.¹³

La adecuada selección de sales inorgánicas y el empleo de formulaciones simples en las suspensiones y soluciones, así como la adición de azida sódica al 0,1 % como agente inhibidor del crecimiento microbiano no deseado, preservaron las propiedades físicas y el funcionamiento de los látex-Ac y controles de la calidad a largo plazo.

Los indicadores de la calidad empleados resultaron adecuados para evaluar signos de deterioro de los componentes, y los valores obtenidos demostraron que el diagnosticador resultó estable en condiciones de uso diario durante 60 d y en condiciones de vida de estante durante 12 meses acorde con la estabilidad del componente menos estable.^{1,14} La obtención de mayores títulos del anti *G. vaginalis* y el empleo de concentraciones en el orden de 10⁷ células/mL para *T. vaginalis* en el control triple pueden ser vías para el mejoramiento del producto.

La estabilidad observada del FemPure permitió establecer el período de validez y disponer del producto durante un período adecuado para su almacenamiento, distribución y uso sin riesgo de falsos resultados por deterioro del producto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CECMED Regulación 25-2000. Requerimientos de los estudios de estabilidad para el registro de productos biológicos y biotecnológicos. CECMED, 2000. Disponible http://www.cecmec.sld.cu/Pages/Reg_LicProd.htm
2. NC-EN 13640. Estudios de estabilidad de diagnosticadores, 2004
3. Remington. The Science and Practice of Pharmacy. 21th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 745-69.
4. ISO 16140. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Protocol for the validation of alternative methods, first edition, 2003.

5. CECMED Regulación 23-2000. Requerimientos de los estudios de estabilidad para el registro de productos farmacéuticos nuevos y conocidos. CECMED, 2000. Disponible http://www.cecmmed.sld.cu/Pages/Reg_LicProd.htm
6. CECMED. Regulación 41. Validación de métodos analíticos. CECMED, 2007, disponible http://www.cecmmed.sld.cu/Pages/Reg_EvalEL.htm
7. Hill GB. The Microbiology of Bacterial Vaginosis. Am J Obstet Gynecol. 1993;169:450-4.
8. Tohill BC, Heilig CM, Klein RS, Rompalo A, Cu-Uvin S, Brown W, et al. Vaginal flora morphotypic profiles and assessment of bacterial vaginosis in women at risk for HIV infection. Infect Dis Obstet Gynecol. 2004;12:121.
9. Morilla G, Bautista C. Introducción a las pruebas de inmunodiagnóstico. Manual de Inmunología. Barcelona: Ed. Diana; 1986. p. 23-37.
10. Tecnote # 204, rev 001, active 8/4/99, jd7/99, Copyright, Bangs Laboratories, Inc, 1999. Disponible en: <http://www.bangslabs.com>
11. Dumont F, Marechal P, Gervais P. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. Appl Environ Microbiol. 2004;70(1):268-72.
12. Liao C, Shollenberger L. Survivability and long-term preservation of bacterial in water and phosphate-buffered saline. Lett Appl Microbiol. 2003;37(1):45-50.
13. Brown HL, Fuller D, Jasper LT, Davis JE, Wright JD. Clinical evaluation of Affirm VPIII test in the detection and identification of *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis* and *Candida* species in vaginitis/vaginosis. Infect Dis Obstet Gynecol. 2004; 12(1):17-21.
14. CECMED. Regulación 20. Buenas Prácticas de Fabricación para Diagnosticadote., CECMED, 2004. Disponible en: http://www.cecmmed.sld.cu/Pages/Reg_Diag.htm

Recibido: 2 de marzo de 2009.

Aprobado: 7 de abril de 2009.

Lic. *Arsenio Betancourt Bravo*. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. Autopista Nacional y de Carretera de Jamaica, Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba. Correo electrónico: arsenio@censa.edu.cu